

MEKANISME UPTAKE DARI BRL 41897A, SUATU DERIVAT SEFALOSPORIN YANG MENGANDUNG KATEKOL, OLEH *KLEBSIELLA PNEUMONIAE*.

MECHANISM OF UPTAKE OF THE CATECHOLIC (7)- α -FORMAMIDO CEPHALOSPORIN BRL 41897A BY *KLEBSIELLA PNEUMONIAE*

M. Kuswandi¹ dan P.A. Lambert².

1) Fakultas Farmasi, UGM., Yogyakarta. 2)

2) Microbiology Research Lab., Aston University, Birmingham, United Kingdom.

ABSTRAK

Kelebihan dari derivat sefalosporin dengan substitusi pada 7 α terhadap yang tidak disubstitusi adalah stabilitas yang lebih besar terhadap serangan enzim β -laktamase dari bakteri. Selain itu, analog 7 α -formamido cefoperazon adalah derivat sefalosporin yang mempunyai aktifitas sangat tinggi, sekitar 2-4 kali lebih aktif daripada derivat ureido atau asil amino. Namun demikian, derivat sefalosporin yang membawa gugus katekol (3,4-dihidroksi) menghasilkan kenaikan aktifitas yang sangat tajam terhadap organisme Gram-negatif terutama terhadap *Escherichia coli*, *Klebsiella pneumoniae* dan *Pseudomonas aeruginosa*. Penelitian ini bertujuan untuk menjawab pertanyaan apakah mekanisme uptake dari salah satu derivat sefalosporin yang membawa katekol didalamnya, BRL 41897A, juga lewat sistem transport Fe atau tidak oleh *K. pneumoniae*.

Hasil penelitian kami menunjukkan bahwa BRL 41897A bukan saja mempunyai aktifitas yang tinggi terhadap bakteri Gram-negatif tetapi juga terhadap *K. pneumoniae* yang memproduksi enzim β -laktamase dan masuk kedalam sel *K. pneumoniae* lewat sistem transport Fe.

Kata kunci: BRL 41897A- katekolik sefalosporin-mekanisme uptake-sistem transport Fe.

ABSTRACT

The advantage of the 7 α -substituted cephalosporin over the unsubstituted derivatives is their greater stability towards bacterial β -lactamase. In addition, the 7 α -formamido cefoperazone analogue was the most potent of the cephalosporin derivatives, being at least 2-4 folds more active than other ureido or acyl amino derivatives. However, the 3,4-dihydroxy derivatives resulted in a pronounced increase in activity against Gram negative organism particularly against *Escherichia coli*, *Klebsiella pneumoniae* and *Pseudomonas aeruginosa*. The aim of this research is to elucidate the mechanism of uptake of a formamido 7-(α)-catecholic cephalosporin BRL 41897A by *K. pneumoniae*.

The results showed that potent activity of this antibiotics results from their ability to penetrate the outer membrane via the tonB dependent high affinity iron transport system which was expressed when bacteria are grown under condition of iron limitation.

BRL 41897A showed high activity to Gram-negative bacteria including β -lactamase producer bacteria and is taken up by *K. pneumoniae* through iron uptake system.

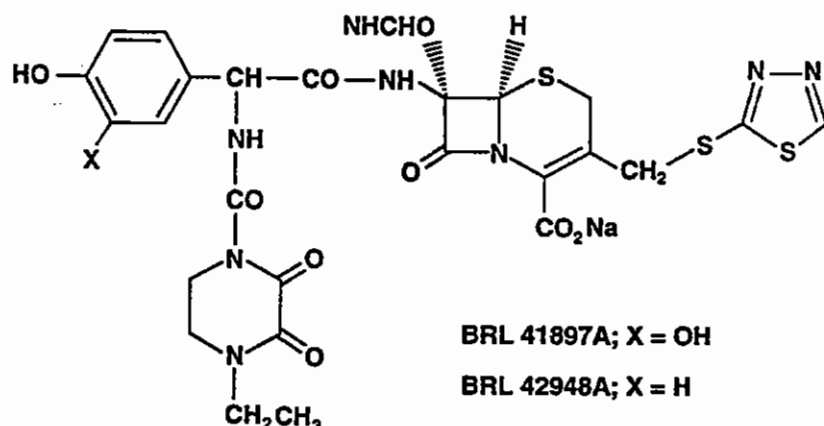
Key words : BRL 41897A-catecholic cephalosporin-uptake mechanism-iron transport sistem.

PENDAHULUAN

K. pneumoniae adalah jenis bakteri patogen nosokomial yang penting (McGowan, 1985), yang memperlihatkan terutama resistensinya terhadap antibiotika (Ullmann, 1978). Infeksi bakteri ini bukan satu-satunya penyebab kematian akan tetapi mempunyai kontribusi yang besar.

Pasien yang terinfeksi *K. pneumoniae* sebagian besar adalah para orang tua (49%) dan 30% dari mereka adalah penderita UTI (urinary tract infectious) (Young, 1982).

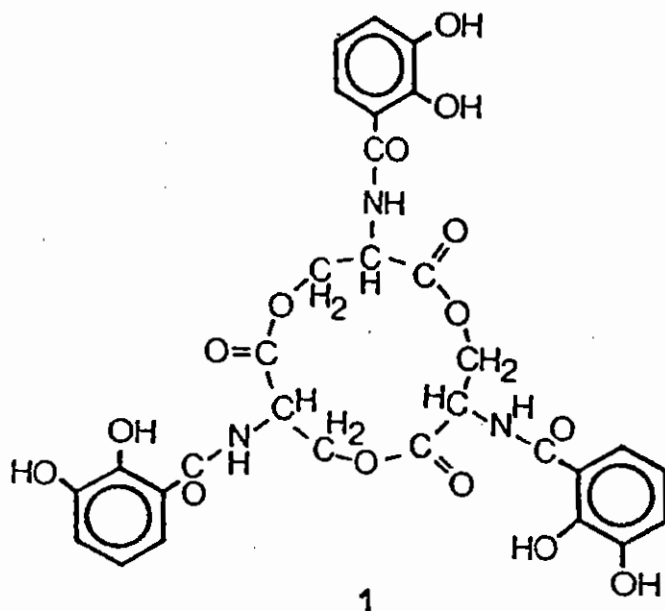
Bakteri tersebut juga patogen yang utama pada neonatal, dengan menyebabkan beberapa infeksi antara lain sepsis, meningitis dan *necrosis enterocolitis* (Hill dkk, 1974), dan infeksi respiratori, terutama pada pasien yang sebelumnya sakit respiratori.



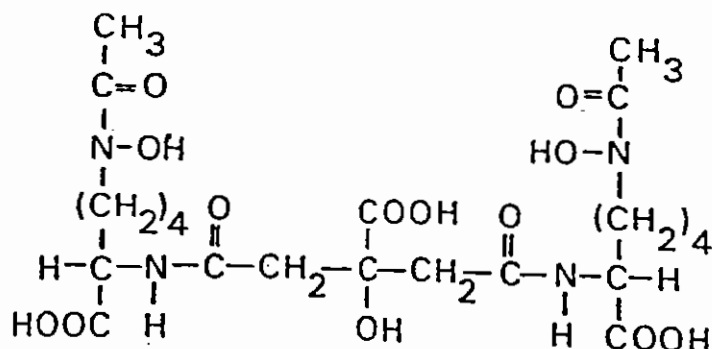
Gambar 1. Struktur molekul dari BRL 41897A dan BRL 42948A.

Telah dilaporkan bahwa dijumpai *K. pneumoniae* yang membawa plasmid dengan aktifitas β -laktamase tinggi sehingga resisten terhadap cefoksitin dan 7- α -metoksi- β laktam serta oksimino β -laktam antibiotika. Bakteri jenis ini telah dijumpai didalam isolat di berbagai negara, antara lain : Korea Selatan dan Yunani (Jacoby dan Medeiros, 1991), Perancis (Nouvellon dkk, 1994), Eropa pada umumnya (Pomull dkk, 1993), Israel (Reish dkk, 1993), Australia (Eisen dkk, 1995), India (Chhibber dan Bajaj, 1995), dan Amerika (Martinez-Martinez dkk, 1996).

Penemuan "extended-spectrum β -laktamase" (ESBL) dalam bakteri basil Gram negatif terutama *K.pneumoniae* dan *E.coli* telah mendapatkan perhatian yang cukup besar, karena bakteri tersebut telah resisten terhadap sefalosporin terbaru dan monobaktam sehingga menyebabkan banyak problem (Weber dkk, 1990). Kemudian dibuat sefalosporin yang membawa substitusi pada 7 α dengan hasil stabilitas yang lebih besar terhadap β -laktamase bakteri daripada sefalosporin yang tidak disubstitusi. Aktifitas terbesar dari derivat tersebut adalah pada substitusi dengan 7 α -formamido sefoperazon atau analognya, yakni sekitar 2-4 kali lebih aktif daripada ureido lain atau derivat asil amino.



Gambar 2a. Formula struktur dari enterobaktin (1)

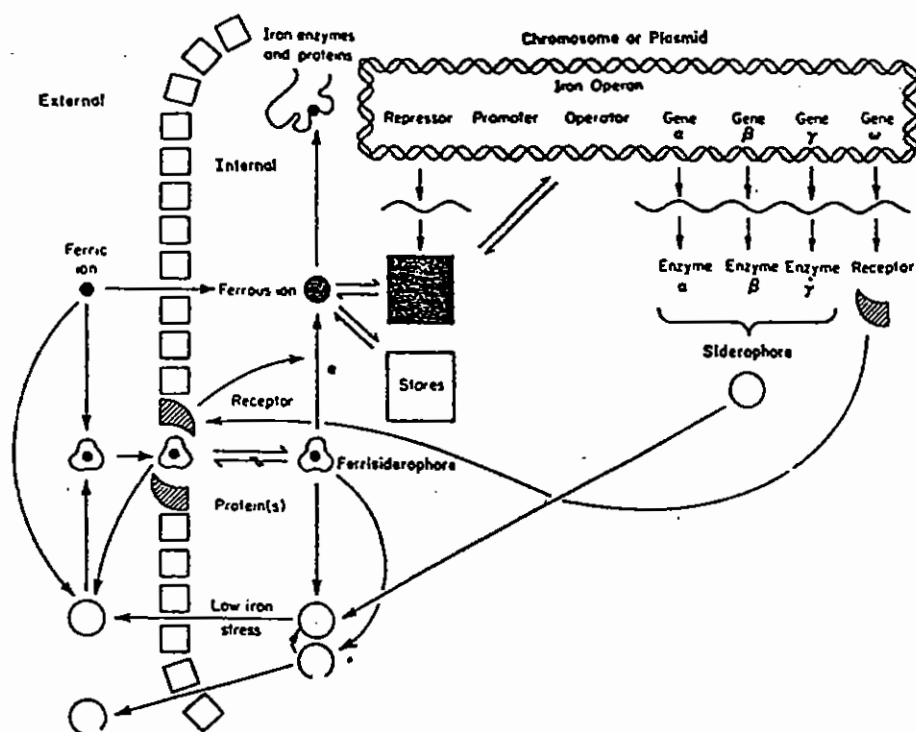


Gambar 2b. Formula struktur dari aerobaktin (2).

Namun demikian, derivat dengan tambahan 3,4-dihidroksi ternyata menghasilkan kenaikan aktifitas yang sangat tinggi terhadap bakteri Gram negatif, terutama terhadap *Escherichia coli*, *Klebsiella pneumoniae* dan *Pseudomonas aeruginosa*. Aktifitas yang tinggi dari antibiotika β -laktam yang membawa katekol tersebut disebabkan karena mereka dapat menembusi "outer membrane" melalui sistem transport Fe yang memakai sistem ton B, yang terekspresi bila bakteri ditumbuhkan diatas media yang kekurangan Fe (Nikaido dan Rosenberg, 1990).

BRL 41897A dan BRL 42948A (Gambar 1) adalah 7- α -formamido sefalosporin yang dirancang oleh para peneliti dari SmithKline-Beecham dengan program rancang kimia didalam menciptakan antibiotika yang stabil dari serangan β -laktamase (Basker dkk, 1986).

Hanya selain sifat stabil terhadap β -laktamase, BRL 41897A yang membawa 2 gugus hidroksi mempunyai aktifitas yang jauh lebih tinggi terhadap bakteri Gram negatif dibanding BRL 42948. Hal tersebut disebabkan karena dengan adanya gugus katekol BRL 41897A menjadi menyerupai siderofor enterobaktin (Gambar 2) sehingga masuk ke dalam sel bakteri dengan memakai sistem transport Fe (Gambar 3).



Gambar 3. Regulasi dari sistem pengambilan Fe oleh bakteri Gram-negatif.

METODOLOGI

Bakteri. *Klebsiella pneumoniae* : M10 KN4401 sebagai indikator dalam tes siderofor Isolat dari R.S. Sardjito : Yo1, Yo2, Yo3.

Escherichia coli : ColV, sebagai kontrol positif dalam tes siderofor.

Enterobacter cloacae : E7, E12, E13 dan E16 sebagai kontrol positif dalam tes produksi β -laktamase.

Membuat media yang mengandung Fe berkadar rendah. Untuk membuat medium dengan Fe berkadar rendah, dipakai medium CAA (Casamino acids) yang telah rutin dipakai pada pertumbuhan *Pseudomonas*. Medium ini terdiri dari 0.5% berat/volume CAA bebas vitamin (Difco), MgSO_4 1mM dan MOPS pH 7,2 1mM dan dipersiapkan dengan alat-alat gelas yang telah dicuci dengan asam dan EDTA kemudian dibilas dengan air bidestilata. Untuk lebih mengurangi jumlah besi maka kedalam media ditambah 300 μM 2,2-dipiridil (Sigma), media bebas Fe tersebut disebut medium Fe-CAA. Sebaliknya pada beberapa eksperimen misalnya untuk menekan siderofor atau ekspresi IROMP (Iron-Regulated Outer Membrane Proteins) atau untuk menentukan efek dari besi terhadap aktifitas antibiotika dipakai medium Fe+CAA yakni medium CAA yang telah ditambah 4 s/d 10 μM FeCl_3 .

Menentukan kadar hambat minimum. Aliquot medium berkadar ganda (2.5ml CAA, Fe-CAA, Fe+CAA atau Nutrient Broth) dimasukkan kedalam tabung-tabung steril. Sejumlah larutan antibiotika steril atau air (blanko) ditambahkan sampai kadar tertentu dalam volume 5ml dan akhirnya ditambah 0,1 ml kultur bakteri yang diuji (ditumbuhkan semalam) yang diencerkan 1/100 kali.

Uji produksi β -laktamase. Satu koloni bakteri tunggal yang diambil dari piring petri disuspensi kedalam 20 μl air suling kemudian ditetaskan kedalam sumuran dari piring mikrotiter diikuti dengan penambahan 20 μl larutan nitrosefin. Aktifitas β -laktamase dapat dilihat dengan terjadinya perubahan warna dari kuning menjadi merah yang terlihat selama 5-30 menit pada temperatur kamar.

Deteksi siderofor secara biologis. Diatas permukaan setiap piring petri yang berisi agar CAA yang berisi 300 μM 2,2-dipiridil ditanam kurang lebih 10^6 bakteri indikator. Kemudian satu kerokan bakteri yang diuji dari permukaan agar lain ditambahkan pada piring petri diatas. Piring petri kemudian dibalik dan diinkubasi pada 37°C semalam. Adanya ikatan Fe-siderofor ditandai dengan adanya pertumbuhan bakteri indikator disekitar koloni bakteri yang diuji yang muncul setelah 12 sampai 48 jam inkubasi. Fe-enterobaktin dideteksi dengan strain indikator *E. coli* AN1937 dan Feri aerobaktin dideteksi dengan *E. coli* LG1522, sedang indikator *K. pneumoniae* KN4401 dipakai untuk mendeteksi ada tidaknya aerobaktin dan atau enterobaktin.

Deteksi siderofor secara kimia

a. Deteksi katekol. Pada tabung gelas kecil berturut-turut ditambahkan 1,15ml air, 0,1ml 20% b/v H_2SO_4 dan 0,5ml larutan yang diuji (supernatan kultur). Kemudian ditambahkan 50 μl 1% b/v feri amonium sitrat dalam 0,09M H_2SO_4 , 0,2ml dari 2M NH_4F , 0,2ml 1% b/v 1,10-fenantrolin monoklorida monohidrat dan 0,3ml dari 3M heksametilentetramin. Tabung

kemudian digojog, inkubasi pada 60°C selama 1 jam, didinginkan pada temperatur kamar, gojog dan serapan dilihat pada 510nm. Percobaan dikontrol dengan mengganti fenantrolin dengan air. Semua reagen dibuat pada hari yang sama dengan penetapan (Rioux dkk, 1983).

b. Deteksi hidroksamat. 1,25ml dari 80% b/v asam merkaptosasetat diencerkan menjadi 50ml air, pH disesuaikan dengan penambahan 2,2 ml larutan NH_3 pekat (0,88 b/v) kemudian diencerkan lagi dengan air sampai 100,0ml. Kepada 25,5ml dari larutan ini ditambah 440 ml dari 30mg/ml $\text{Fe}(\text{NO}_3)_3 \cdot 9\text{H}_2\text{O}$ yang diencerkan menjadi 50,0ml dengan 0,5M $\text{NH}_4\text{HCO}_3/\text{NH}_4\text{OH}$ pH8,5. Sejumlah 0,35ml dari larutan terakhir digojog dengan 0,7ml larutan yang diuji (supernatan kultur), diinkubasi dalam gelap selama 5 menit, gojog dan serapannya diukur pada 532nm. Blangko dilakukan dengan media steril pengganti sampel. Reagen dibuat segar dan disimpan dalam gelap (Arnold and Viswanatha, 1983).

Uptake kompleks Fe-BRL 41897A. Kultur semalam dari *K. pneumoniae* diencerkan 1 dalam 20 didalam CAA media dan diinkubasikan pada 37°C selama 4 jam dalam suatu penggoyang yang berputar sampai mencapai fase log. Sel kemudian dipanen pada temperatur kamar dengan sentrifugasi 10.000 g selama 15 menit. Pelet sel dicuci dua kali dengan 0,1 mM larutan dapar MOPS pH7, dan kemudian disuspensi dalam dapar yang sama sampai mencapai "optical density" pada 470 nm sebesar 2,0. Suspensi sel dan larutan lain yang terpisah campuran dari 30 μM BRL 41897A, 100 nM $^{55}\text{FeCl}_3$ (0,477 Gbq/mg, Amersham) dan dapar MOPS disebut kompleks ^{55}Fe -BRL 41897A, diinkubasikan dalam suatu "water bath" pada 37°C selama 30 menit. Sejumlah volume yang sama dari kompleks tersebut ditambahkan kedalam suspensi sel dan setiap 0,2 ml porsi dari suspensi tersebut disaring melalui filter membran (diameter 25mm, ukuran pori 0,2 μm , filter membran nitrat selulose, Whatman) pada interval yang sesuai menggunakan suatu siring dan penahan filter Swinnex. Filter-filter kemudian dicuci segera dengan dua kali 10 ml porsi dari 0,5M HCl, dikeringkan diudara terbuka, kemudian radioaktif diukur dengan Penganalisa scintilasi cair 1600 TR Packard Tri-Carb, menggunakan ^3H window setting, dan waktu hitung 1,00 min dengan latar belakang 10,0 menit.

HASIL DAN PEMBAHASAN

Kadar hambat minimum (KHM). KHM dari BRL 41897A terhadap *K.pneumoniae* strain M10 dalam Fe-CAA adalah 4 kali lebih besar daripada didalam Fe+CAA, sedang KHM BRL 42948A baik didalam media Fe-CAA maupun Fe+CAA adalah sama yakni 1 $\mu\text{g/ml}$ (Tabel I).

Tabel I. Pengaruh Fe terhadap KHM dari BRL 41897A dan BRL 42948A.

Strain	KHM dari BRL 41897A ($\mu\text{g/ml}$)		KHM dari BRL 42948A ($\mu\text{g/ml}$)	
	Fe-CAA	Fe+CAA	Fe-CAA	Fe+CAA
M10	0,25	1,0	1,0	1,0

Hasil penelitian (Tabel I) menunjukkan bahwa sensitifitas *K.pneumoniae* M10 terhadap BRL 41897A adalah sangat tergantung kepada Fe dan "uptake" dari antibiotika dinaikkan dengan berfungsinya sistem uptake dari Fe.

Aktifitas yang tinggi dari BRL 41897A dibanding aktifitas BRL 42948A dalam medium Fe-CAA kemungkinan besar karena kemampuan BRL 41897A mengikat Fe dan menggunakan jalur transport siderofor masuk kedalam sel (Gambar 3). Gugus katekol dari BRL 41897A menyerupai gugus dihidroksibenzoil dari enterobaktin, sebaliknya gugus singel p-hidroksifenil dari BRL 42948A tidak dapat mengikat Fe.

Tabel II. Tes adanya siderofor (enterobaktin dan/atau aerobaktin) dari bakteri dengan cara biologis dan cara kimia.

Strain	pertumbuhan dari <i>K. pneumoniae</i> KN4401	katekol (510nm)	hidroksamat (532nm)
<i>E.coli</i> ColV(kontrol positif)	+		
<i>K.pneumoniae</i> M10	+	0,301	0,105

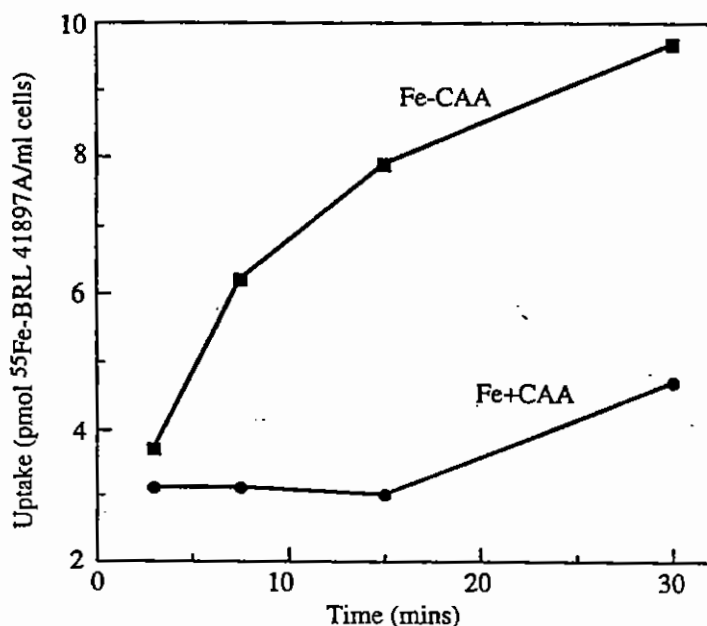
Hasil tes siderofor (Tabel II) dengan cara biologis dengan menggunakan bakteri indikator *K. pneumoniae* KN4401 menunjukkan bahwa *K.pneumoniae* M10 memproduksi siderofor, sedang upaya untuk menunjukkan apakah siderofor enterobaktin atau aerobaktin gagal didapat dengan cara biologi akan tetapi dengan cara kimiawi dengan memakai spektrofotometer menunjukkan bahwa strain M10 memproduksi baik senyawa katekol maupun hidroksamat.

Tabel III. Produksi β -laktamase dengan nitrosefin dan KHM dari isolat *K.pneumoniae*.

Strain	β -laktamase	KHM (μ g/ml)
<i>Enterobacter cloacae</i> (kontrol positif)		
E7	+	
E12	++	
E13	+	
E16	+	
<i>K.pneumoniae</i>		
M10	-	1,56
Yo1	+	1,56
Yo2	++	3,12
Yo3	+	0,22

Dari hasil tes dengan nitrosefin terlihat bahwa ketiga isolat *K.pneumoniae* dari R.S. Dr.Sardjito, Yogyakarta yang resisten terhadap beberapa antibiotika, memproduksi β -laktamase (Tabel 3) tetapi masih sensitif terhadap BRL 41897A terlebih isolat Yo3

Uji uptake dari kompleks ^{55}Fe -BRL 41897A mendukung uji KHM bahwa didalam Fe-CAA media BRL 41897A diabsorpsi oleh sel lebih besar dibanding dalam media yang mengandung Fe (Gambar 4).



Gambar 4. Pengaruh waktu pada uptake dari ^{55}Fe -BRL 41897A oleh sel dari strain M10 dalam media Fe-CAA dan Fe+CAA.

KESIMPULAN

K. pneumoniae yang merupakan salah satu jenis bakteri patogen nosokomial dan telah memperlihatkan multiresisten terhadap berbagai antibiotika, dalam penelitian ini ternyata sangat sensitif terhadap antibiotika BRL 41897A. Sensitifitas isolat *Klebsiella pneumoniae* tidak berkurang walaupun mereka memproduksi enzim β -laktamase. Hal tersebut disebabkan karena selain BRL 41897A dirancang untuk tahan terhadap enzim β -laktamase dari bakteri, senyawa tersebut juga mempunyai gugus katekol didalam struktur molekulnya sehingga dapat menyerupai

siderofor enterobaktin yang masuk kedalam sel bakteri melalui sistem transport Fe. Adanya siderofor dalam *K.pneumoniae* telah ditunjukkan baik dengan uji secara biologis maupun kimiawi. Dari uji uptake Fe-BRL 41897A menegaskan bahwa BRL 41897A masuk kedalam sel. Dari uji uptake Fe-BRL 41897A menegaskan bahwa BRL 41897A masuk kedalam sel *K.pneumoniae* dengan melalui sistem transport Fe.

DAFTAR PUSTAKA

- Basker, M.J., R.A. Edmonson, S.J. Knott, R.J. Ponsford, B. Slocombe and S.S. White. 1984. In vitro antibacterial properties of BRL 36650, a novel 6 α -substituted penicillin. *Antimicrob. Ag. Chemother.*, 26:734-740.
- Basker, M.J., C.L. Branch, S.C. Finch, A.W. Guest, P.H. Milner, M.J. Pearson, R.J. Ponsford and T.C. Smak. 1986. Studies on semi-synthetic 7 α -formamido cephalosporins. *J. Antibiotics*. 39(2):1788-1791.
- Chhibber, S. and S. Bajaj. 1995. Polysaccharide-iron-regulated cell surface protein conjugate vaccine: its role in protection against *K. pneumoniae*-induced lobar pneumonia. *Vaccine*, 13: 179-184.
- Eisen, D., E.G. Russell, M. Tymms, E.J. Roper, M.L. Grayson and J. Turnidge. 1995. Random amplified Polymorphic DNA and plasmid analysis used in investigation of an outbreak of multi-resistant *K. pneumoniae*. *J. Clin. Microbiol.* 33(3):713-717.
- Hill, H.R., C.E. Hunt and J.M. Matsen. 1974. Nosocomial colonisation with *klebsiella* type 26 in a neonatal intensive-care unit associated with an outbreak of sepsis, meningitis and necrotizing endocolitis. *J. Pediatrics*. 85:415-419.
- Jacoby, G.A. and A.A. Medeiros. 1991. More extended-spectrum- β lactamase. *Antimicrob. Ag. Chemother.*, 35(9):1697-1704.
- Martinez-Martinez, L., S. Hernandez-Alex, S. Alberti, J.M. Tomas, V.J. Benedi and G.A. Jacoby. 1996. In vivo selection of porin-deficient mutants of *K. pneumoniae* with increased resistance to cefoxitin and expanded-spectrum cephalosporin. *Antimicrob. Ag. Chemother.*, 40(2):342-347.
- Mc.Gowan, J.E. 1985. Changing etiology of nosocomial bacteremia and fungemia and other hospital acquired infections. *Rev. Inf. Dis.*, 7(suppl):s357-s370.
- Nikaido, H. and E.Y. Rosenberg. 1990. Cir and Fiu proteins in the outer membrane of *E. coli* catalyze transport of monomeric catechols: study with β -lactam antibiotics containing catechol and analogous groups. *J. Bacteriol.*, 172:1361-1367.
- Nouvellon, M., J.L. Pons, D. Sirot, M.L. Combe and J.F. Lenuland. 1994. Clonal outbreaks of ESBL producing strains *K. pneumoniae* demonstrated by antibiotic susceptibility testing, β -lactamase typing and multilocus enzyme electrophoresis. *J. Clin. Microbiol.*, 32(10):2625-2627.

Pornull, K.J., E.Goranson, A.S. Rytting and K. Dornbusch. 1993. ESBL in *E.coli* and *Klebsiella* spp. in European septicaemia isolates. J. Antimicrob. Chemother., 32:559-570.

Reish, O., S. Ashkenazi, N.Naor, Z. Samra and p. Merlob. 1993. An outbreaks of multiresistant *Klebsiella* in a neonatal intensive care unit. J. Hosp. Infect., 25:287- 291.

Ullmann, U. 1978. The patterns of multiple resistance in *Enterobacteriaceae* of hospitalized patients. Infection, 6:s219-s223.

Weber, D.A., C.C. Sanders, J.S. Bakken and J.P. Quinn. 1990. A novel chromosomal TEM derivative and alterations in outer membrane proteins together mediate selective ceftazidime resistance in *E. coli*. J. Infect.Dis., 162:460-465.

Young, S.E.J. 1982. Bacteraemia: a survey of cases reported to the PHLS communicable disease surveillance centre. J. Infection, 5: 19-26

